

日本国特許庁

JAPAN PATENT OFFICE

14.5.2004

30 SEP 2005

10/551550

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 4月18日

出願番号  
Application Number: 特願2003-113965  
[ST. 10/C]: [JP2003-113965]

出願人  
Applicant(s): 生化学工業株式会社

REC'D 08 JUL 2004

WIPO

PCT

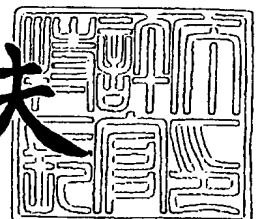
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J200300710

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00  
C12P 19/00  
A61K 38/43

【発明者】

【住所又は居所】 東京都練馬区関町北 1 丁目 1 8 番地 7 第 3 泉マンション 3 0 5 号室

【氏名】 田中 雅之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都東大和市上北台 1 - 9 0 2 - 2 2 6

【氏名】 京ヶ島 守

【特許出願人】

【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100124512

【弁理士】

【氏名又は名称】 堀口 努

【電話番号】 03-3270-0465

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2003- 97301

【出願日】 平成15年 3月31日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 062307

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0300379

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【整理番号】 J 200300710

【発明の名称】 糖鎖の切断触媒

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質を必須成分とし、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有する触媒。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 コンドロイチン、デルマタン硫酸及びケラタン硫酸を切断する能力を有しないことを特徴とする、請求項 1 に記載の触媒。

【請求項 3】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質を必須成分とする、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖の特異的切断剤。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 コンドロイチン、デルマタン硫酸及びケラタン硫酸を切断しない目的で用いられることを特徴とする、請求項 3 に記載の切断剤。

【請求項 5】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質を必須成分とし、生体組織中に存在するヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられることを特徴とする医薬。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項 6】 コンドロイチン、デルマタン硫酸及びケラタン硫酸を切断しない目的で用いられることを特徴とする、請求項 5 に記載の医薬。

【請求項 7】 生体組織が、髄核であることを特徴とする、請求項 5 又は 6 に記載の医薬。

【請求項 8】 医薬が、椎間板ヘルニアの処置剤であることを特徴とする、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 9】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質を、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、当該糖鎖を特異的に切断する方法。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項 10】 コンドロイチン、デルマタン硫酸及びケラタン硫酸を切断しないことを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質を、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、低分子量化された当該糖鎖を特異的に生産する方法。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コン

ドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項12】 低分子量化されたコンドロイチン、デルマトン硫酸及びケラタン硫酸を生産しないことを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項13】 下記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、請求項1又は2に記載の触媒の製造方法。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項14】 下記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、請求項3又は4に記載の切断剤の製造方法。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項15】 下記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、請求項5～8のいずれか1項に記載の医薬の製造方法。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 16】 下記 (A) 又は (B) のタンパク質と他のペプチドとの融合タンパク質。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C 及びコンドロイチン硫酸 D からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【請求項 17】 コンドロイチン、デルマタン硫酸及びケラタン硫酸を切断する能力を有しないことを特徴とする、請求項 16 に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な糖鎖切断触媒、糖鎖の特異的切断剤等に関する。

【0002】

【従来の技術】

まず、本明細書中で共通して用いる略号について説明する。

【0003】

HA：ヒアルロン酸

CH：コンドロイチン

CSA：コンドロイチン硫酸 A

CSC：コンドロイチン硫酸 C

CSD：コンドロイチン硫酸 D

DS (CSB と表記することもある)：デルマタン硫酸

GPC:ゲル浸透クロマトグラフィー

KS:ケラタン硫酸

なおCSAは、「グルクロン酸残基とN-アセチルガラクトサミン残基とが $\beta$ 1, 3グリコシド結合した二糖単位」が連続して結合されてなる分子であって、「グルクロン酸残基( $\beta$ 1-3) 4位が硫酸化されたN-アセチルガラクトサミン残基」からなる二糖単位を主たる構成成分とするCSである。

【0004】

CSCは、「グルクロン酸残基とN-アセチルガラクトサミン残基とが $\beta$ 1, 3グリコシド結合した二糖単位」が連続して結合されてなる分子であって、「グルクロン酸残基( $\beta$ 1-3) 6位が硫酸化されたN-アセチルガラクトサミン残基」からなる二糖単位を主たる構成成分とするCSである。

【0005】

CSDは、「グルクロン酸残基とN-アセチルガラクトサミン残基とが $\beta$ 1, 3グリコシド結合した二糖単位」が連続して結合されてなる分子であって、「2位が硫酸化されたグルクロン酸残基( $\beta$ 1-3) 6位が硫酸化されたN-アセチルガラクトサミン残基」からなる二糖単位を主たる構成成分とするCSである。

【0006】

非特許文献1には、ヒアルロニダーゼの一種であるHYAL1が記載されている。また非特許文献2には、HYAL1の全アミノ酸配列及びこれをコードするcDNAの全塩基配列が開示されている。

【0007】

【非特許文献1】

The Journal of Biological Chemistry, Vol.277, p33654-33663 (2002)

【非特許文献2】

Biochemical and biophysical research communications, 236(1), p10-15, (1997)

しかし、HYAL1がCH、CSB及びKSを切断する活性を実質的に有さず、CSA、CSC及びCSDを切断する活性を有することは知られていない。

【0008】



**【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、HYAL1を必須成分とする新規な糖鎖切断触媒、糖鎖の特異的切断剤等を提供することを課題とする。

**【0009】****【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、HYAL1を必須成分とする新規な糖鎖切断触媒、糖鎖の特異的切断剤及び医薬、並びにHYAL1を特定の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む糖鎖の特異的切断方法、HYAL1を特定の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、低分子量化された当該糖鎖を特異的に生産する方法、HYAL1を保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、前記触媒の製造方法、HYAL1を保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、前記切断剤の製造方法、及びHYAL1を保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、前記医薬の製造方法等を提供するに至った。

**【0010】**

すなわち本発明は、下記(A)又は(B)のタンパク質を必須成分とし、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有する触媒(以下、「本発明触媒」という)を提供する。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

**【0011】**

本発明触媒は、CH、DS及びKSを切断する能力を有しないものが好ましい。

**【0012】**

また本発明は、下記(A)又は(B)のタンパク質を必須成分とする、HA、

CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖の特異的切断剤（以下、「本発明切断剤」という）を提供する。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0013】

本発明切断剤は、CH、DS及びKSを切断しない目的で用いられるものが好ましい。

#### 【0014】

また本発明は、下記(A)又は(B)のタンパク質を必須成分とし、生体組織中に存在するHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられることを特徴とする医薬（以下、「本発明医薬」という）を提供する。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0015】

本発明医薬は、CH、DS及びKSを切断しない目的で用いられるものが好ましい。

#### 【0016】

また、本発明医薬による切断対象となる糖鎖が存在する「生体組織」は、髄核であることが好ましい。また本発明医薬は、椎間板ヘルニアの処置剤であることが好ましい。

#### 【0017】

また本発明は、下記(A)又は(B)のタンパク質を、HA、CSA、CSC

及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、当該糖鎖を特異的に切断する方法（以下、「本発明切断方法」という）を提供する。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0018】

本発明切断方法は、CH、DS及びKSを切断しないことが好ましい。

#### 【0019】

また本発明は、下記(A)又は(B)のタンパク質を、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、低分子量化された当該糖鎖を特異的に生産する方法（以下、「本発明糖鎖生産方法」という）を提供する。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0020】

本発明糖鎖生産方法は、低分子量化されたCH、DS及びKSを生産しないことが好ましい。

#### 【0021】

また本発明は、下記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明触媒の製造方法（以下、「本発明触媒製造方法」という）を提供する。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

#### 【0022】

また本発明は、下記 (a) 又は (b) のいずれかを保持する DNA を用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明切断剤の製造方法（以下、「本発明切断剤製造方法」という）を提供する。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

#### 【0023】

また本発明は、下記 (a) 又は (b) のいずれかを保持する DNA を用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明医薬の製造方法（以下、「本発明医薬製造方法」という）を提供する。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

#### 【0024】

さらに本発明は、下記 (A) 又は (B) のタンパク質と他のペプチドとの融合タンパク質（以下、「本発明融合タンパク質」という）を提供する。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

本発明融合タンパク質は、CH、DS 及び KS を切断する能力を有しないものが好ましい。

#### 【0025】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明を、発明の実施の形態によって詳説する。

##### < 1 > 本発明触媒

本発明触媒は、下記 (A) 又は (B) のタンパク質を必須成分とし、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有する触媒である。

(A) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0026】

(A) のタンパク質は HYAL 1 のタンパク質である。

#### 【0027】

なお、天然に存在するタンパク質には、それをコードする DNA の多型や変異の他、生成後のタンパク質の細胞内及び精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないタンパク質と実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように (A) のタンパク質に対して構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないタンパク質も、本発明触媒の必須成分として用いることができる。人為的にタンパク質のアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場

合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン2 活性を保持することが知られている (Science, 224, 1431 (1984))。また、ある種のタンパク質は、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるタンパク質に存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、又は活性型タンパク質への転換に際して除去される。このようなタンパク質は、一次構造上は異なった形で存在しているが、最終的には (A) のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質である。上記の (B) のタンパク質は、このようなタンパク質を規定するものである。

#### 【0028】

本明細書において「数個のアミノ酸」とは、HYAL 1 の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば600アミノ酸残基からなるタンパク質の場合、2～30程度、好ましくは2～15、より好ましくは2～8以下の数を示す。

#### 【0029】

また本発明触媒における上記 (A) 及び (B) のタンパク質のアミノ酸配列には、他のタンパク質やペプチドのアミノ酸配列が含まれていても良い。すなわち上記 (A) 及び (B) のタンパク質は、他のペプチドとの融合タンパク質であっても良い。本発明は、このような上記 (A) 又は (B) のタンパク質と他のペプチドとの融合タンパク質 (本発明融合タンパク質) をも提供する。本明細書における「他のペプチド」という用語は、「ポリペプチド」を含む概念として用いる。

#### 【0030】

本発明融合タンパク質としては、HYAL 1 とマーカーペプチドとの融合タンパク質等が例示される。このような本発明融合タンパク質は、精製や分析を容易にすることができるというメリットがある。上記マーカーペプチドとしては例えばFLAGペプチド、プロテインA、インスリンシグナル配列、His、CBP (カルモジ

ユリン結合タンパク質)、GST (グルタチオン S-トランスフェラーゼ) などが挙げられる。例えばFLAGペプチドとの融合タンパク質は、抗FLAG抗体を結合させた固相を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製することができる。プロテインAとの融合タンパク質は、IgGを結合させた固相を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって簡便に精製することができる。同様に、Hisタグとの融合タンパク質については磁性ニッケルを結合させた固相を用いることができる。またインスリンシグナルとの融合タンパク質は、細胞外(培地等)に分泌されることから、細胞破碎等の抽出操作が不要となる。本発明融合タンパク質は、なかでもFLAGペプチドとの融合タンパク質であることが好ましい。

#### 【0031】

本発明融合タンパク質は、以下の通り製造することができる。

#### 【0032】

まず、前記(A)のタンパク質(配列番号2におけるアミノ酸番号1~435で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質)をコードするDNA(以下「DNA(a)」という)を用意する。このDNAは、配列番号2におけるアミノ酸番号1~435で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするものである限りにおいて特に限定されない。このようなDNAとしては、遺伝暗号の縮重によって種々の異なったヌクレオチド配列を有するDNAが存在するが、配列番号1におけるヌクレオチド番号1~1308で示されるヌクレオチド配列によって特定されるDNAが好ましい。このDNAは、GenBank accession No. U03056として登録されている。

#### 【0033】

また、前記(A)のタンパク質に代えて前記(B)のタンパク質をコードするDNA(以下「DNA(b)」という)を用いてもよい。「DNA(b)」は、前記(A)のアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有する限りにおいて特に限定されない。

## 【0034】

これらの糖鎖を切断する活性を有するか否かは、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。例えば、後述の実施例に示すようなGPCにおける糖鎖のピークの移動によって検出することができ、この方法によって検出されることが好ましい。

## 【0035】

また、HA、CSA、CSC及びCSD以外の種々の基質（糖鎖）を用いて、GPCにおける糖鎖のピークの移動の有無を検出することにより、HA、CSA、CSC及びCSDに対する切断活性の特異性の有無を検出することができる。このような方法によって、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を保持しているアミノ酸の欠失、置換、挿入又は転位を容易に選択することができる。

このような「DNA (b)」としては、例えば「DNA (a)」若しくは当該DNAに相補的なDNA又はこれらのDNAの塩基配列を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが例示される。

## 【0036】

ここで「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジェントな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mMHEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100 $\mu$ g/mlサケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1%SDS溶液、50℃下で0.1×SSC、0.1%SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。

## 【0037】

上記DNA (a) 又はDNA (b) のいずれかを保持するDNAを用いたタンパク質の発現は、当該DNAが保持されたベクター（好ましくは発現ベクター）を用いて行うことが好ましい。DNAのベクターへの組込みは、通常の方法によって行うことができる。



## 【0038】

DNAを導入するベクターとしては、例えば、導入したDNAを発現させることができる適当な発現ベクター（ファージベクター或いはプラスミドベクター等）を使用することができ、本発明ベクターを組み込む宿主細胞に応じて適宜選択できる。このような宿主-ベクター系としては、大腸菌（*E. coli*）と、pET15b（Novagen社製）、pTrcHis（インビトロゲン社製）、pGEX（ファルマシア バイオテック社製）、pTrc99（ファルマシア バイオテック社製）、pKK233-3（ファルマシア バイオテック社製）、pEZZZ18（ファルマシア バイオテック社製）、pCH110（ファルマシア バイオテック社製）、pBAD（インビトロゲン社製）、pRS ET（インビトロゲン社製）又はpSE420（インビトロゲン社製）等の原核細胞用の発現ベクターとの組み合わせ、COS細胞や3LL-HK46細胞などの哺乳類細胞と、pGIR201（Kitagawa, H., and Paulson, J. C. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1394-1401）、pEF-BOS（Mizushima, S., and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acid Res.* 18, 5322）、pCXN2（Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) *Gene* 108, 193-200）、pCMV-2（イーストマン コダック（Eastman Kodak）製）、pCEV18、pME18S（丸山ら, *Med. Immunol.*, 20, 27(1990)）又はpSVL（ファルマシア バイオテック社製）等の哺乳類細胞用発現ベクターの組み合わせのほか、宿主細胞として酵母、枯草菌などが例示され、これらに対応する各種ベクターが例示される。上述の宿主-ベクター系の中でも特に原核細胞（特に大腸菌細胞）とpET15bとの組み合わせが好ましい。

## 【0039】

また、宿主細胞として昆虫細胞を用いることもできる。この場合にも、昆虫細胞に対応する各種ベクターを用いることができる。昆虫細胞としては、高発現S<sup>F</sup>+細胞（*expresSf*+（登録商標））を用いることが好ましい。また、DNAを組み込むトランスファーベクターとしてはpPSC8やpPSC12が好ましい。DNAをpPSC8に組み込む場合には、SmaI、KpnI、PstI、XbaI、NruI、BglIIIを利用して組み込みを行うことができる。DNAをpPSC12に組み込む場合には、SmaI、KpnI、PstI、BglIIIを利用して組み込みを行うことができる。また、タンパク質のN末端にFLAGペプチドが融合されたかたちで発現されるようにするために、トランスファ

ーベクターに組み込む前に、対応するDNAの末端にFLAGペプチドをコードする配列を付加しておくことが好ましい。

#### 【0040】

DNAをトランスファーベクターに組み込んだ後、これをバキュウロウイルスに導入することが好ましい。バキュウロウイルスとしては、*Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcNPV) や、*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) を用いることが好ましい。そして、目的とするDNAが導入されたバキュウロウイルスを昆虫細胞に感染させればよい。

#### 【0041】

DNAを組み込むベクターは、目的とするタンパク質とマーカーペプチドとの融合タンパク質を発現するように構築されたものを用いることができる。DNAからのタンパク質の発現及び発現されたタンパク質の採取も、通常の方法に従って行うことができる。

#### 【0042】

例えば、目的とするDNAが組み込まれた発現ベクターを適当な宿主に導入することによって宿主を形質転換し、この形質転換体を生育させ、その生育物から発現されたタンパク質を採取することによって行うことができる。

#### 【0043】

本発明触媒は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有しており、この能力の有無も、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。その方法の説明は前記と同様である。なかでも、HA、CSA、CSC及びCSDの4種類の糖鎖のみを特異的に切断する能力を有するものが好ましい。

#### 【0044】

また本発明触媒は、CH、DS及びKSを切断する能力を有しないものが好ましい。CH、DS及びKSに対する切断能力の有無も、前記と同様にCH、DS又はKSを基質として用いて、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。

#### 【0045】

本発明触媒は、少なくとも前記の (A) 又は (B) のタンパク質を含んでいればよい。すなわち本発明触媒は、前記の (A) 又は (B) のタンパク質自体をそのまま本発明触媒としてもよく、前記の (A) 又は (B) のタンパク質に加えて、これらのタンパク質に悪影響を与えず、かつ、本発明の効果に影響を与えない限りにおいて、他の成分を含有させてもよい。

#### 【0046】

本発明触媒の製造方法も特に限定されず、天然物から上記 (A) 又は (B) のタンパク質を単離してもよく、化学合成等によって上記 (A) 又は (B) のタンパク質を製造してもよく、遺伝子工学的手法によって上記 (A) 又は (B) のタンパク質を製造してもよい。遺伝子工学的手法によって本発明触媒を製造する方法については、後述の本発明触媒製造方法を参照されたい。

#### 【0047】

本発明触媒の形態も限定されず、溶液形態、凍結形態、凍結乾燥形態、担体と結合した固定化酵素形態のいずれであってもよい。

#### <2>本発明切断剤

本発明切断剤は、下記 (A) 又は (B) のタンパク質を必須成分とする、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖の特異的切断剤である。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0048】

本発明切断剤は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有しており、この能力の有無も、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。その方法の説明は前記と同様である。なかでも、HA、CSA、CSC及びCSDの4種類の糖鎖のみを特異的に切断する切断剤であることが好ましい。

## 【0049】

また本発明切断剤は、CH、DS及びKSを切断する能力を有しないものが好ましい。CH、DS及びKSに対する切断能力の有無も、前記と同様にCH、DS又はKSを基質として用いて、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。

## 【0050】

そして本発明切断剤は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられるが、このような目的の下でCH、DS及びKSを切断しない目的で用いられることが好ましい。

## 【0051】

本発明切断剤の製剤化には、公知の方法を用いることができる。また本発明切断剤の形態も特に限定されず、例えば溶液状態、凍結状態、凍結乾燥状態、担体と結合した固定化酵素形態のいずれであってもよい。

## 【0052】

本発明切断剤に関するその他の説明は、前記の「<1>本発明触媒」と同様である。遺伝子工学的手法によって本発明切断剤を製造する方法については、後述の本発明切断剤製造方法を参照されたい。

## &lt;3&gt;本発明医薬

本発明医薬は、下記(A)又は(B)のタンパク質を必須成分とし、生体組織中に存在するHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられることを特徴とする医薬である。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

## 【0053】

本発明医薬は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有しており、この能力の有無も、低分

子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。その方法の説明は前記と同様である。なかでも、HA、CSA、CSC及びCSDの4種類の糖鎖のみを特異的に切断する医薬であることが好ましい。

#### 【0054】

また本発明医薬は、CH、DS及びKSを切断する能力を有しないものが好ましい。CH、DS及びKSに対する切断能力の有無も、前記と同様にCH、DS又はKSを基質として用いて、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。

#### 【0055】

そして本発明医薬は、生体組織中に存在するHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられるが、このような目的の下でCH、DS及びKSを切断しない目的で用いられることが好ましい。

#### 【0056】

また本発明医薬が適用される生体組織は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断することが望まれる生体組織である限りにおいて特に限定されない。例えば、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖が、健常状態におけるレベルよりも過剰に存在しているような生体組織が挙げられる。このような生体組織として具体的には髄核が例示され、なかでも椎間板ヘルニアの状態にある髄核が好ましい。すなわち本発明医薬は、椎間板ヘルニアの処置剤であることが好ましい。本明細書における「処置」の用語には、予防、進行抑制（悪化防止）、改善、治療等を目的とする処置が含まれる。

#### 【0057】

近年、コンドロイチナーゼを椎間板に投与して髄核を融解し、椎間板ヘルニアを治療する試みが現に行われている（米国特許第4696816号、Clinical Orthopaedics, 253, 301-308 (1990)）。このことから、コンドロイチン硫酸を切断する活性を有する本発明医薬は、同様に椎間板ヘルニアの処置剤として十分に利用しうるものである。

## 【0058】

そして本発明医薬が適用される動物も特に限定されないが、脊椎動物であることが好ましく、なかでも哺乳類であることが好ましい。哺乳類としては、ヒト、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ヒツジ等が提示されるが、ヒトに対して適用されるものが特に好ましい。

## 【0059】

本発明医薬の投与方法は、本発明医薬による生体組織中のHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖の特異的切断作用が発揮される限りにおいて特に限定されないが、例えば注射による投与が挙げられる。本発明医薬を髄核に適用する場合には、目的とする髄核が存在する椎間板又は脊髓硬膜外腔に注射することが好ましい。

## 【0060】

投与方法に応じて上記(A)又は(B)のタンパク質を適宜製剤化して、本発明医薬とすることができる。剤形としては、注射剤(溶液、懸濁液、乳濁液、用時溶解用固形剤等)、錠剤、カプセル剤、液剤等が挙げられる。なかでも注射剤が好ましい。

本発明医薬の投与量は、上記(A)又は(B)のタンパク質の種類、比活性、投与される動物の種類や症状等、投与対象となる生体組織の種類やその状態等によって個別的に設定されるべきものであり、特に限定されない。

## 【0061】

本発明医薬に関するその他の説明は、前記の「<1>本発明触媒」と同様である。遺伝子工学的手法によって本発明医薬を製造する方法については、後述の本発明医薬製造方法を参照されたい。

## &lt;4&gt;本発明切断方法

本発明切断方法は、下記(A)又は(B)のタンパク質を、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、当該糖鎖を特異的に切断する方法である。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が

欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

#### 【0062】

上記(A)及び(B)のタンパク質に関する説明は、前記の「<1>本発明触媒」と同様である。上記(A)又は(B)のタンパク質を、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖に作用させる方法は、これらの分子が相互に接触して酵素反応が生ずる状態となる限りにおいて特に限定されず、例えば前者に後者を添加してもよく、後者に前者を添加してもよく、両者を同時に添加してもよい。

#### 【0063】

また、上記(A)及び(B)のタンパク質を担体(例えば、ゲル、ビーズ、膜、プレート等)に固定させ、これとHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖とを接触させてもよい。

#### 【0064】

両者を接触させた後の反応の条件は、上記(A)又は(B)のタンパク質が作用する条件である限りにおいて特に限定されないが、これらのタンパク質の至適pH付近(例えばpH4～pH5程度)で反応させることが好ましく、当該pH下で緩衝作用を有する緩衝液中で反応を行うことがより好ましい。またこのときの温度も、これらのタンパク質の活性が保持されている限りにおいて特に限定されないが、35℃～40℃程度が例示される。またこれらのタンパク質の活性を増加させる物質がある場合には、その物質を添加してもよい。反応時間は、pH条件、温度条件、作用させるタンパク質及び糖鎖の量、及びどの程度の切断(低分子量化)を所望するか等によって適宜調節することができる。反応時間を長くすれば切断(低分子量化)の程度を増すことができ、反応時間を短くすればその程度を減ずることができる。

#### 【0065】

また本発明切断方法には、このようなタンパク質の作用工程が少なくとも含まれていればよく、さらに他の工程が含まれていてもよい。

## 【0066】

本発明切断方法によって、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖が特異的に切断される。これらの糖鎖が切断されたか否かは、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。その方法の説明は前記と同様である。なかでも、HA、CSA、CSC及びCSDの4種類の糖鎖のみを特異的に切断する方法であることが好ましい。

## 【0067】

また本発明切断方法は、CH、DS及びKSを切断しないことが好ましい。CH、DS及びKSが切断されていないことも、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって検出することができる。

## 【0068】

すなわち本発明切断方法は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられるが、このような目的の下でCH、DS及びKSを切断しない目的で用いられることが好ましい。

## 【0069】

本発明切断方法に関するその他の説明は、前記の「<1>本発明触媒」と同様である。

## &lt;5&gt;本発明糖鎖生産方法

本発明糖鎖生産方法は、下記(A)又は(B)のタンパク質を、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖に作用させる工程を少なくとも含む、低分子量化された当該糖鎖を特異的に生産する方法である。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

## 【0070】



本発明糖鎖生産方法により、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖が低分子量化された糖鎖を特異的に生産することができる。低分子量化された糖鎖が生産されたか否かは、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって確認することができる。その方法の説明は前記と同様である。なかでも、HA、CSA、CSC及びCSDの4種類の糖鎖のみを特異的に生産する方法であることが好ましい。

#### 【0071】

また本発明糖鎖生産方法は、低分子量化されたCH、DS及びKSを生産しないことが好ましい。CH、DS及びKSが生産されていないことも、低分子量化した糖鎖の一般的な検出方法によって確認することができる。

#### 【0072】

すなわち本発明糖鎖生産方法は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断するために用いられるが、このような目的の下でCH、DS及びKSを切断しない目的で用いられることが好ましい。

#### 【0073】

生成物から低分子量化された糖鎖を単離する方法等は、公知の方法によって行うことができる。

#### 【0074】

本発明糖鎖生産方法に関するその他の説明は、前記の「<1>本発明触媒」及び「<4>本発明切断方法」と同様である。

#### <6>本発明触媒製造方法

本発明触媒製造方法は、下記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明触媒の製造方法である。

(a) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

(b) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、C

SC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【0075】

上記(a)のDNAは、配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするものである限りにおいて特に限定されない。このようなDNAとしては、遺伝暗号の縮重によって種々の異なった塩基配列を有するDNAが存在するが、配列番号1で示される塩基配列によって特定されるDNAが好ましい。配列番号1で示されるDNAは、GenBank accession No. U03056 として登録されている。

【0076】

上記(b)のDNAも、配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードするものである限りにおいて特に限定されない。このようなDNAとしては、例えば上記(a)に記載のDNA若しくは当該DNAに相補的なDNA又はこれらのDNAの塩基配列を有するDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAが例示される。

【0077】

ここで「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジェントな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、4×SSC、50mMHEPES (pH7.0)、10×Denhardt's solution、100μg/mlサケ精子DNAを含む溶液中、42℃でハイブリダイズさせ、次いで室温で2×SSC、0.1%SDS溶液、50℃下で0.1×SSC、0.1%SDS溶液で洗浄する条件が挙げられる。

【0078】

上記(a)又は(b)のいずれかを保持するDNAを用いたタンパク質の発現

は、当該DNAが保持されたベクター（好ましくは発現ベクター）を用いて行うことが好ましい。DNAのベクターへの組込みは、通常の方法によって行うことができる。

#### 【0079】

DNAを導入するベクターとしては、例えば、導入したDNAを発現させることができる適当な発現ベクター（ファージベクター或いはプラスミドベクター等）を使用することができ、本発明ベクターを組込む宿主細胞に応じて適宜選択できる。このような宿主-ベクター系としては、COS細胞、3LL-HK46細胞などの哺乳類細胞と、pGIR201 (Kitagawa, H., and Paulson, J. C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 1394-1401)、pEF-BOS (Mizushima, S., and Nagata, S. (1990) Nucleic Acid Res. 18, 5322)、pCXN2 (Niwa, H., Yamanura, K. and Miyazaki, J. (1991) Gene 108, 193-200)、pCMV-2（イーストマン コダック (Eastman Kodak) 製）、pCEV18、pME18S（丸山ら, Med. Immunol., 20, 27(1990)）又はpSVL（ファルマシア バイオテック社製）等の哺乳類細胞用発現ベクターとの組み合わせ、大腸菌 (*E. coli*) と、pTrcHis（インビトロゲン社製）、pGEX（ファルマシア バイオテック社製）、pTrc99（ファルマシア バイオテック社製）、pKK233-3（ファルマシア バイオテック社製）、pEZZZ18（ファルマシア バイオテック社製）、pCH110（ファルマシア バイオテック社製）、pET（ストラタジーン社製）、pBAD（インビトロゲン社製）、pRSET（インビトロゲン社製）、及びpSE420（インビトロゲン社製）等の原核細胞用の発現ベクターとの組み合わせ、昆虫細胞とバキュロウイルスとの組み合わせのほか、宿主細胞として酵母、枯草菌などが例示され、これらに対応する各種ベクターが例示される。上述の宿主-ベクター系の中でも特に哺乳類細胞（特にCOS細胞）とpFLAG-CMV6（SIGMA社製）との組み合わせが好ましい。

#### 【0080】

また、DNAを組込むベクターは、目的とするタンパク質とマーカーペプチドとの融合タンパク質を発現するように構築されたものを用いることもできる。DNAからのタンパク質の発現及び発現されたタンパク質の採取も、通常の方法に従って行うことができる。

**【0081】**

例えば、目的とするDNAが組み込まれた発現ベクターを適当な宿主に導入することによって宿主を形質転換し、この形質転換体を生育させ、その生育物から発現されたタンパク質を採取することによって行うことができる。

**【0082】**

ここで「生育」とは、形質転換体である細胞や微生物自体の増殖や、形質転換体である細胞を組み込んだ動物・昆虫等の生育を含む概念である。また、ここでいう「生育物」とは、形質転換体を生育させた後の培地（培養液の上清）及び培養された宿主細胞・分泌物・排出物等を包含する概念である。生育の条件（培地や培養条件等）は、用いる宿主に合わせて適宜選択できる。

**【0083】**

生育物からのタンパク質の採取も、タンパク質の公知の抽出・精製方法によって行うことができる。

**【0084】**

例えば目的とするタンパク質が、培地（培養液の上清）中に分泌される可溶性の形態で産生される場合には、培地を採取し、これをそのまま用いてもよい。また目的とするタンパク質が細胞質中に分泌される可溶性の形態、又は不溶性（膜結合性）の形態で産生される場合には、窒素キャビテーション装置を用いる方法、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、又はこれらの組み合わせ等の処理操作によって目的とするタンパク質を抽出することができ、その抽出物をそのまま用いてもよい。

**【0085】**

これらの培地や抽出物から、タンパク質をさらに精製することもできる。精製は、不完全な精製（部分精製）であっても、完全な精製であってもよく、目的とするタンパク質の使用目的等に応じて適宜選択することができる。

**【0086】**

精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム（硫安）や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオ

ン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

#### 【0087】

目的とするタンパク質が製造されたか否かは、アミノ酸配列、作用、基質特異性等を分析することによって確認することができる。

#### 【0088】

また本発明切断方法には、以上のような発現・採取工程が少なくとも含まれていればよく、さらに他の工程が含まれていてもよい。

#### <7>本発明切断剤製造方法

本発明切断剤製造方法は、下記 (a) 又は (b) のいずれかを保持する DNA を用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明切断剤の製造方法である。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSSC 及び CSD からなる群から選ばれる 1 又は 2 以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

#### 【0089】

本発明切断剤製造方法に関するその他の説明は、前記の「<6>本発明触媒製造方法」と同様である。

#### <8>本発明医薬製造方法

本発明医薬製造方法は、下記 (a) 又は (b) のいずれかを保持する DNA を用いてタンパク質を発現させ、発現されたタンパク質を採取する工程を少なくとも含む、本発明医薬の製造方法である。

(a) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列における 1 もしくは数個のアミノ酸が

欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列からなり、かつ、HA、CSA、CSSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

#### 【0090】

本発明医薬製造方法に関するその他の説明は、前記の「<6>本発明触媒製造方法」と同様である。

#### 【0091】

##### 【実施例】

以下に、本発明の実施例を具体的に説明する。しかしながら、これらによって本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

##### (1) HYAL1 遺伝子の発現

COS-7細胞を、10%のウシ胎児血清を含むDMEM培地中で約20～40%コンフルエントになるまで培養した。培養は5%CO<sub>2</sub>の下で37℃で実施した。

配列番号1で示される塩基配列(HYAL1のcDNA)をpFLAG-CMV6ベクターに組み込んだヒアルロニダーゼ発現ベクターを、TransFast Transfection kit (Promega社製)を用いてCOS-7細胞にトランスフェクトし、10%のウシ胎児血清を含むDMEM培地中、37℃で3日間培養した。培養は5%CO<sub>2</sub>の下で37℃で実施した。

また、配列番号1で示される塩基配列(HYAL1のcDNA)が組み込まれていないpFLAG-CMV6ベクターをトランスフェクトした細胞についても、同様に培養した。

##### (2) 酵素液の調製

上記(1)で培養された細胞(HYAL1のcDNAを組み込んだ発現ベクターをトランスフェクトしたもの、又はHYAL1のcDNAを組み込んでいない発現ベクターをトランスフェクトしたものを)、10mM Tris-HCl(pH7.4又はpH6.0)、0.5% Triton X-100及び0.25M シュークロースを含有する溶液中、氷冷下でセルスクレーパーを用い破碎した。この破碎後の液をそのまま酵素液として用いた。

##### (3) 基質特異性の解析

(2)で調製された酵素液を種々の基質と反応させることによって、酵素の基

質特異性を解析した。反応は、0.25%の各種基質、0.15M NaCl、及び50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4又はpH5) 又はリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6又はpH7) を含有する反応混合液に (2) で調製された酵素を最終濃度 20% (vol/vol) となるよう添加し、37℃で4日間インキュベートすることによって行った。

ここで用いた基質は、以下の通りである。

\*HS: (鶏冠由来; 生化学工業株式会社製)

\*CH: (サメ由来; 生化学工業株式会社製)

\*CSA (クジラ軟骨由来; 生化学工業株式会社製)

このCSは、生化学工業株式会社の試薬カタログコード番号400650として同社から販売されているものであり、以下の性質を有する。

- ・セルロースアセテート膜電気泳動で単一のバンドを示す。
- ・窒素含量: 2.4 ~ 2.8% (Z. Anal. Chem., 22, p366(1883)に記載の方法で測定)
- ・硫黄含量: 6.2 ~ 6.6% (Mikrochim. Acta., 123(1955)に記載の方法で測定)
- ・ガラクトサミン含量: 32.0 ~ 37.0% (アミノ酸自動分析器)
- ・グルクロン酸含量: 35.0 ~ 40.0% (カルバゾール反応)
- ・分子量: 25,000 ~ 50,000 (Biochem. J., 23, pp517(1929)に記載の方法で測定)
- ・4-硫酸/6-硫酸: 80/20 (J. Biol. Chem., 243, p1536 (1968)に記載の方法で測定)

\*DS (ブタ皮由来; 生化学工業株式会社製)

このDS (CSB) は、生化学工業株式会社の試薬カタログコード番号400660として同社から販売されているものであり、以下の性質を有する。

- ・赤外分光光度計で純粋と判断される
- ・窒素含量: 2.4 ~ 2.9% (Z. Anal. Chem., 22, p366(1883)に記載の方法で測定)
- ・硫黄含量: 6.2 ~ 6.9% (Mikrochim. Acta., p123(1955)に記載の方法で測定)

- ・ガラクトサミン含量: 32.0 ~ 37.0 % (アミノ酸自動分析器)
- ・イズロン酸含量: 36.0 ~ 42.0 % (カルバゾール反応)
- ・分子量: 11,000 ~ 25,000 (Biochem. J., 23, p517(1929)に記載の方法で測定)

\* C S C (サメ軟骨由来; 生化学工業株式会社製)

この C S は、生化学工業株式会社の試薬カタログコード番号400670として同社から販売されているものであり、以下の性質を有する。

- ・セルロースアセテート膜電気泳動で単一のバンドを示す。
- ・窒素含量: 2.3 ~ 2.7 % (Z. Anal. Chem., 22, p366(1883)に記載の方法で測定)

- ・硫黄含量: 6.4 ~ 6.8 (Mikrochim. Acta., p123(1955)に記載の方法で測定)

- ・ガラクトサミン含量: 32.0 ~ 37.0 % (アミノ酸自動分析器)
- ・グルクロン酸含量: 34.0 ~ 39.0 % (カルバゾール反応)
- ・分子量: 40,000 ~ 80,000 (Biochem. J., 23, pp517(1929)に記載の方法で測定)

- ・4-硫酸 / 6-硫酸: 10 / 90 (J. Biol. Chem., 243, p1536 (1968)に記載の方法で測定)

\* C S D (サメ軟骨由来; 生化学工業株式会社製)

この C S は、生化学工業株式会社の試薬カタログコード番号400676として同社から販売されているものであり、以下の性質を有する。

- 窒素含量: 2.2 ~ 2.6 % (Z. Anal. Chem., 22, p366(1883)に記載の方法で測定)

- 硫黄含量: 7.1 ~ 7.7 % (Mikrochim. Acta., 123(1955)に記載の方法で測定)

- ガラクトサミン含量: 30 ~ 35 % (アミノ酸自動分析器)

- グルクロン酸含量: 32 ~ 35 % (カルバゾール反応)

\* K S (ウシ角膜由来; 生化学工業株式会社製)

この K S は、生化学工業株式会社の試薬カタログコード番号400760として同社から販売されているものであり、以下の性質を有する。



- ・セルロースアセテート膜電気泳動で単一のバンドを示す。
  - ・窒素含量: 2.2 ~ 3.0 % (Z. Anal. Chem., 22, p366(1883)に記載の方法で測定)
  - ・硫黄含量: 6.5 ~ 8.0 % (Mikrochim. Acta., p123(1955)に記載の方法で測定)
  - ・ガラクトース含量: 34 ~ 40 % (Biochem. J., 50, p298 (1952)に記載の方法で測定)
  - ・ガラクトサミン含量: 検出限界以下 (アミノ酸自動分析器)
  - ・グルコサミン含量: 30 ~ 40 % (HITACHI KLA-5; 株式会社日立製作所製)
- インキュベート後の溶液を、ゲル浸透クロマトグラフィー (カラム: TSKgel-G2500PWXL、TSKgel-G3000PWXL及びTSKgel-G4000PWXLの3本。溶出液は0.2M NaCl、流速は0.6mL/分) に付し、屈折率ピークの位置の移動を観察した。

#### 【0092】

基質としてHAを用いた場合の結果を図1に、CHを用いた場合の結果を図2に、CSAを用いた場合の結果を図3に、CSBを用いた場合の結果を図4に、CSCを用いた場合の結果を図5に、CSDを用いた場合の結果を図6に、KSを用いた場合の結果を図7にそれぞれ示す。各グラフの縦軸は屈折率を、横軸は時間 (保持時間) を示す。各図の上段はHYAL1のcDNAをトランスフェクトしていない細胞の酵素液を、下段はHYAL1のcDNAをトランスフェクトした細胞の酵素液をそれぞれ用いた場合の結果である。また図中の最も太い実線はpH7、次に太い実線はpH6、最も細い実線はpH5、点線はpH4の反応混合液中でそれぞれ反応させたときの結果を示す。グラフの中央付近に存在するピークの保持時間が、上段のグラフ (HYAL1のcDNAをトランスフェクトしていない) よりも長時間側にシフトした場合には、基質が低分子量化されたことになる。

#### 【0093】

図1より、HYAL1のcDNAをトランスフェクトした細胞の酵素液をpH4又はpH5の条件下でHAに作用させると、中央付近に存在するピークが長時間側にシフトした (HAが低分子量化された)。このことから、HYAL1のcDNAでトランスフェクトした細胞では、HAを切断する活性を有するHYAL1が実際に発現されて

いることが確認された。

#### 【0094】

図2、図4及び図7より、HYAL1のcDNAをトランスフェクトした細胞の酵素液をpH4～7の条件下でCH、CSB又はKSに作用させても、中央付近に存在するピークのシフトは観察されなかった（これらの基質は低分子量化されなかった）。このことから、HYAL1はCH、CSB及びKSを切断する活性を実質的に有しないことが示された。

#### 【0095】

図3、図5及び図6より、HYAL1のcDNAをトランスフェクトした細胞の酵素液をpH4又はpH5の条件下でCSA、CSC又はCSDに作用させると、中央付近に存在するピークが長時間側にシフトした（これらの基質が低分子量化された）。このことから、HYAL1はCSA、CSC及びCSDを切断する活性を有することが示された。

#### 【0096】

以上の結果から、HYAL1はHAのみならずCSA、CSC及びCSDを切断する活性を有するが、CH、DS（CSB）及びKSを切断する活性を実質的に有しないことが示された。

#### 【0097】

また、インキュベート後の溶液は不飽和糖を反映する210nmの吸収を示さなかったことから、HYAL1はCSA、CSC及びCSDを加水分解により切断することが示された。

#### 【0098】

##### 【発明の効果】

本発明触媒及び本発明切断剤は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有することから、このような糖鎖を特異的に切断（低分子量化）することができ極めて有用である。また本発明医薬は、生体組織中に存在するHA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断することができることから、切断を望むこのような糖鎖のみを切断し、切断を望まない糖鎖を残存させる

ことができ極めて有用である。さらに本発明医薬（本発明触媒、本発明切断剤）は、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を加水分解により切断することから、細菌由来のリアーゼ酵素と違って不飽和も生成せず、さらに安全性が高い医薬とすることができる可能性があり、極めて有用である。

#### 【0099】

また本発明切断方法も、HA、CSA、CSC及びCSDからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断でき極めて有用である

本発明糖鎖生産方法も、低分子量化された所定の糖鎖を特異的に、かつ簡便、迅速、大量、安価に生産することができ極めて有用である。

#### 【0100】

本発明触媒製造方法、本発明切断剤製造方法及び本発明医薬製造方法も、本発明触媒、本発明切断剤及び本発明医薬を簡便、迅速、大量かつ安価に製造することができ、極めて有用である。本発明融合タンパク質も、本発明触媒、本発明切断剤や本発明医薬の必須成分とすることができ、極めて有用である。

#### SEQUENCE LISTING

- <110> Seikagaku Corporation
- <120> Catalyst for cleaving a sugar chain
- <130> J200300710
  
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.1
  
- <210> 1
- <211> 1308
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1308)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

atg gca gcc cac ctg ctt ccc atc tgc gcc ctc ttc ctg acc tta ctc	48
Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu	
1                      5                      10                      15	
gat atg gcc caa ggc ttt agg ggc ccc ttg cta ccc aac cgg ccc ttc	96
Asp Met Ala Gln Gly Phe Arg Gly Pro Leu Leu Pro Asn Arg Pro Phe	
20                      25                      30	
acc acc gtc tgg aat gca aac acc cag tgg tgc ctg gag agg cac ggt	144
Thr Thr Val Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Glu Arg His Gly	
35                      40                      45	
gtg gac gtg gat gtc agt gtc ttc gat gtg gta gcc aac cca ggg cag	192
Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Pro Gly Gln	
50                      55                      60	
acc ttc cgc ggc cct gac atg aca att ttc tat agc tcc cag ctg ggc	240
Thr Phe Arg Gly Pro Asp Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly	
65                      70                      75                      80	
acc tac ccc tac tac acg ccc act ggg gag cct gtg ttt ggt ggt ctg	288
Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu	
85                      90                      95	
ccc cag aat gcc agc ctg att gcc cac ctg gcc cgc aca ttc cag gac	336
Pro Gln Asn Ala Ser Leu Ile Ala His Leu Ala Arg Thr Phe Gln Asp	
100                      105                      110	
atc ctg gct gcc ata cct gct cct gac ttc tca ggg ctg gca gtc atc	384
Ile Leu Ala Ala Ile Pro Ala Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile	

115	120	125	
gac tgg gag gca tgg cgc cca cgc tgg gcc ttc aac tgg gac acc aag			432
Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Thr Lys			
130	135	140	
gac att tac cgg cag cgc tca cgg gca ctg gta cag gca cag cac cct			480
Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Ala Gln His Pro			
145	150	155	160
gat tgg cca gct cct cag gtg gag gca gta gcc cag gac cag ttc cag			528
Asp Trp Pro Ala Pro Gln Val Glu Ala Val Ala Gln Asp Gln Phe Gln			
165	170	175	
gga gct gca cgg gcc tgg atg gca ggc acc ctc cag ctg ggg cgg gca			576
Gly Ala Ala Arg Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Arg Ala			
180	185	190	
ctg cgt cct cgc ggc ctc tgg ggc ttc tat ggc ttc cct gac tgc tac			624
Leu Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr			
195	200	205	
aac tat gac ttt cta agc ccc aac tac acc ggc cag tgc cca tca ggc			672
Asn Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Ser Gly			
210	215	220	
atc cgt gcc caa aat gac cag cta ggg tgg ctg tgg ggc cag agc cgt			720
Ile Arg Ala Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Gly Gln Ser Arg			
225	230	235	240
gcc ctc tat ccc agc atc tac atg ccc gca gtg ctg gag ggc aca ggg			768
Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Met Pro Ala Val Leu Glu Gly Thr Gly			
245	250	255	
aag tca cag atg tat gtg caa cac cgt gtg gcc gag gca ttc cgt gtg			816
Lys Ser Gln Met Tyr Val Gln His Arg Val Ala Glu Ala Phe Arg Val			
260	265	270	
gct gtg gct gct ggt gac ccc aat ctg ccg gtg ctg ccc tat gtc cag			864

Ala Val Ala Ala Gly Asp Pro Asn Leu Pro Val Leu Pro Tyr Val Gln	
275	280
285	
atc ttc tat gac acg aca aac cac ttt ctg ccc ctg gat gag ctg gag	912
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu	
290	295
300	
cac agc ctg ggg gag agt gcg gcc cag ggg gca gct gga gtg gtg ctc	960
His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu	
305	310
315	320
tgg gtg agc tgg gaa aat aca aga acc aag gaa tca tgt cag gcc atc	1008
Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile	
325	330
335	
aag gag tat atg gac act aca ctg ggg ccc ttc atc ctg aac gtg acc	1056
Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr	
340	345
350	
agt ggg gcc ctt ctc tgc agt caa gcc ctg tgc tcc ggc cat ggc cgc	1104
Ser Gly Ala Leu Leu Cys Ser Gln Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg	
355	360
365	
tgt gtc cgc cgc acc agc cac ccc aaa gcc ctc ctc ctc ctt aac cct	1152
Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu Leu Asn Pro	
370	375
380	
gcc agt ttc tcc atc cag ctc acg cct ggt ggt ggg ccc ctg agc ctg	1200
Ala Ser Phe Ser Ile Gln Leu Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Ser Leu	
385	390
395	400
cgg ggt gcc ctc tca ctt gaa gat cag gca cag atg gct gtg gag ttc	1248
Arg Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Gln Ala Gln Met Ala Val Glu Phe	
405	410
415	
aaa tgt cga tgc tac cct ggc tgg cag gca ccg tgg tgt gag cgg aag	1296
Lys Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Gln Ala Pro Trp Cys Glu Arg Lys	
420	425
430	

agc atg tgg tga

1308

Ser Met Trp

435

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

Met Ala Ala His Leu Leu Pro Ile Cys Ala Leu Phe Leu Thr Leu Leu  
1                    5                    10                    15  
Asp Met Ala Gln Gly Phe Arg Gly Pro Leu Leu Pro Asn Arg Pro Phe  
                  20                    25                    30  
Thr Thr Val Trp Asn Ala Asn Thr Gln Trp Cys Leu Glu Arg His Gly  
                  35                    40                    45  
Val Asp Val Asp Val Ser Val Phe Asp Val Val Ala Asn Pro Gly Gln  
                  50                    55                    60  
Thr Phe Arg Gly Pro Asp Met Thr Ile Phe Tyr Ser Ser Gln Leu Gly  
65                    70                    75                    80  
Thr Tyr Pro Tyr Tyr Thr Pro Thr Gly Glu Pro Val Phe Gly Gly Leu  
                  85                    90                    95  
Pro Gln Asn Ala Ser Leu Ile Ala His Leu Ala Arg Thr Phe Gln Asp  
                  100                    105                    110  
Ile Leu Ala Ala Ile Pro Ala Pro Asp Phe Ser Gly Leu Ala Val Ile  
                  115                    120                    125  
Asp Trp Glu Ala Trp Arg Pro Arg Trp Ala Phe Asn Trp Asp Thr Lys

130	135	140
Asp Ile Tyr Arg Gln Arg Ser Arg Ala Leu Val Gln Ala Gln His Pro		
145	150	155
Asp Trp Pro Ala Pro Gln Val Glu Ala Val Ala Gln Asp Gln Phe Gln		160
	165	170
		175
Gly Ala Ala Arg Ala Trp Met Ala Gly Thr Leu Gln Leu Gly Arg Ala		
	180	185
		190
Leu Arg Pro Arg Gly Leu Trp Gly Phe Tyr Gly Phe Pro Asp Cys Tyr		
	195	200
		205
Asn Tyr Asp Phe Leu Ser Pro Asn Tyr Thr Gly Gln Cys Pro Ser Gly		
	210	215
		220
Ile Arg Ala Gln Asn Asp Gln Leu Gly Trp Leu Trp Gly Gln Ser Arg		
225	230	235
		240
Ala Leu Tyr Pro Ser Ile Tyr Met Pro Ala Val Leu Glu Gly Thr Gly		
	245	250
		255
Lys Ser Gln Met Tyr Val Gln His Arg Val Ala Glu Ala Phe Arg Val		
	260	265
		270
Ala Val Ala Ala Gly Asp Pro Asn Leu Pro Val Leu Pro Tyr Val Gln		
	275	280
		285
Ile Phe Tyr Asp Thr Thr Asn His Phe Leu Pro Leu Asp Glu Leu Glu		
	290	295
		300
His Ser Leu Gly Glu Ser Ala Ala Gln Gly Ala Ala Gly Val Val Leu		
305	310	315
		320
Trp Val Ser Trp Glu Asn Thr Arg Thr Lys Glu Ser Cys Gln Ala Ile		
	325	330
		335
Lys Glu Tyr Met Asp Thr Thr Leu Gly Pro Phe Ile Leu Asn Val Thr		
	340	345
		350
Ser Gly Ala Leu Leu Cys Ser Gln Ala Leu Cys Ser Gly His Gly Arg		
	355	360
		365



Cys Val Arg Arg Thr Ser His Pro Lys Ala Leu Leu Leu Leu Asn Pro  
370 375 380  
Ala Ser Phe Ser Ile Gln Leu Thr Pro Gly Gly Gly Pro Leu Ser Leu  
385 390 395 400  
Arg Gly Ala Leu Ser Leu Glu Asp Gln Ala Gln Met Ala Val Glu Phe  
405 410 415  
Lys Cys Arg Cys Tyr Pro Gly Trp Gln Ala Pro Trp Cys Glu Arg Lys  
420 425 430  
Ser Met Trp  
435

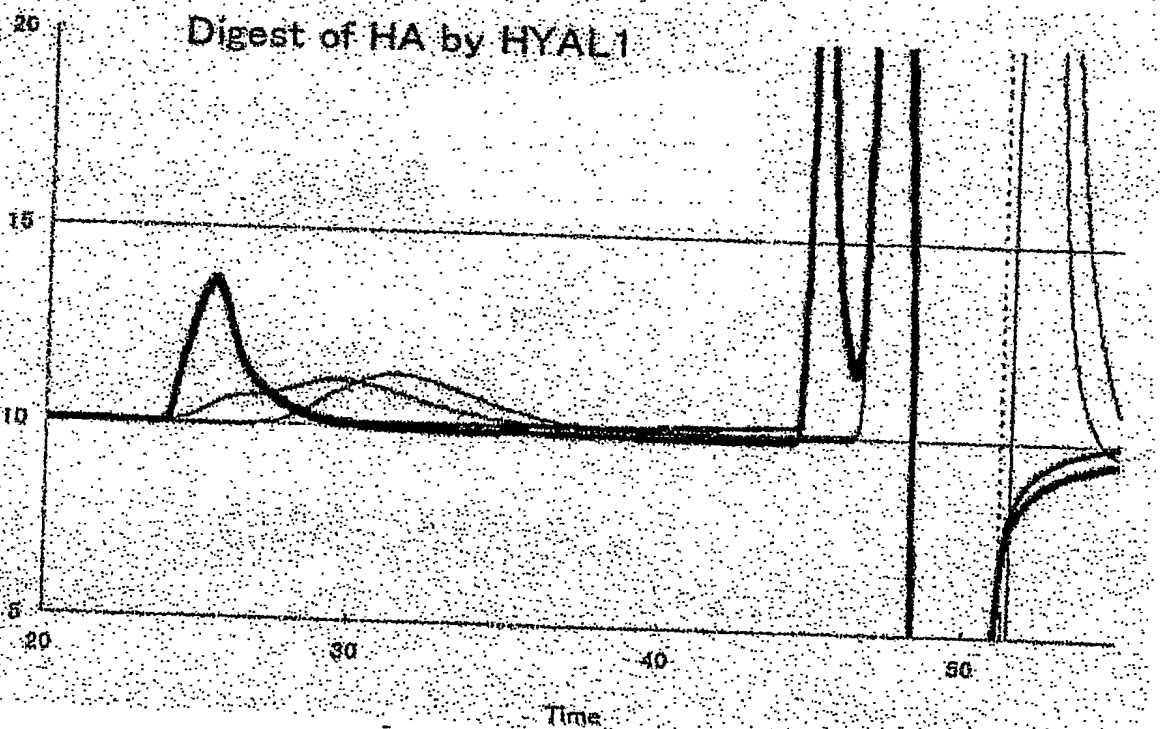
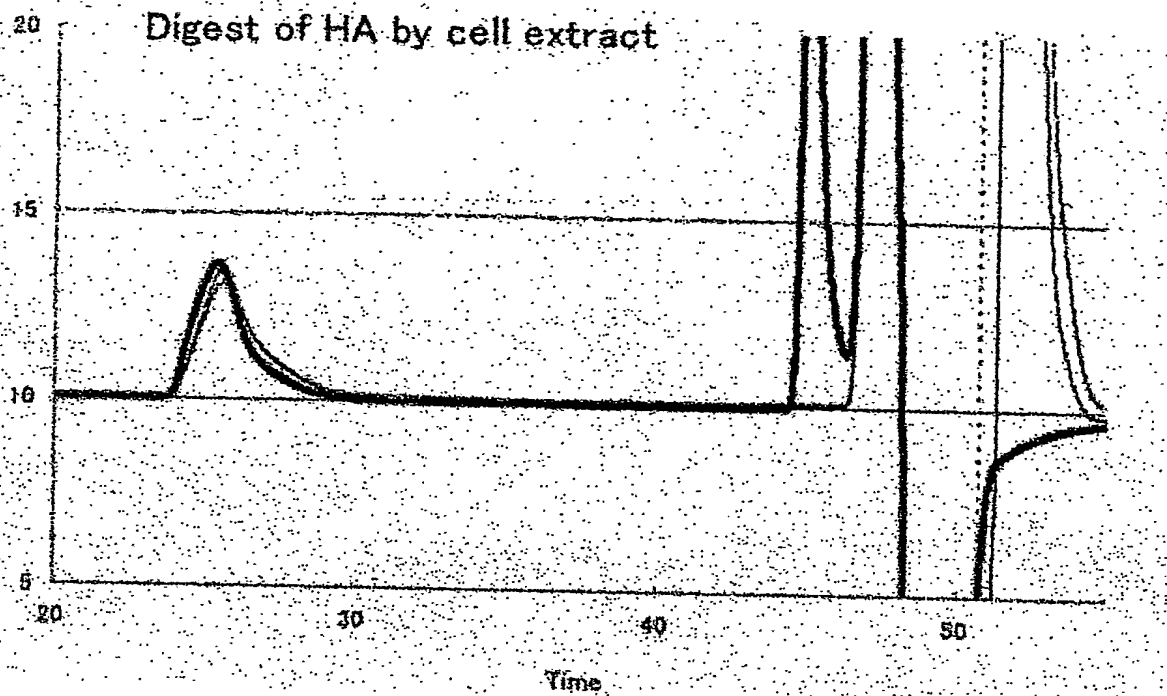
**【図面の簡単な説明】**

- 【図 1】 HYAL1の基質としてH Aを用いた場合の結果を示す。
- 【図 2】 HYAL1の基質としてC Hを用いた場合の結果を示す。
- 【図 3】 HYAL1の基質としてC S Aを用いた場合の結果を示す。
- 【図 4】 HYAL1の基質としてC S Bを用いた場合の結果を示す。
- 【図 5】 HYAL1の基質としてC S Cを用いた場合の結果を示す。
- 【図 6】 HYAL1の基質としてC S Dを用いた場合の結果を示す。
- 【図 7】 HYAL1の基質としてK Sを用いた場合の結果を示す。

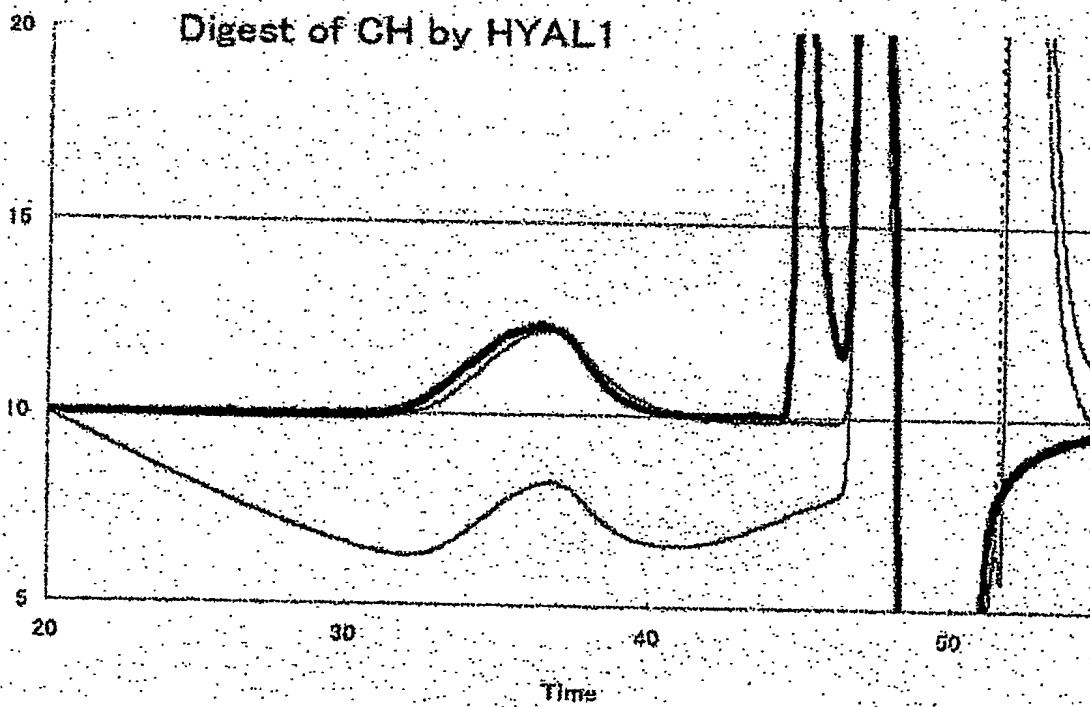
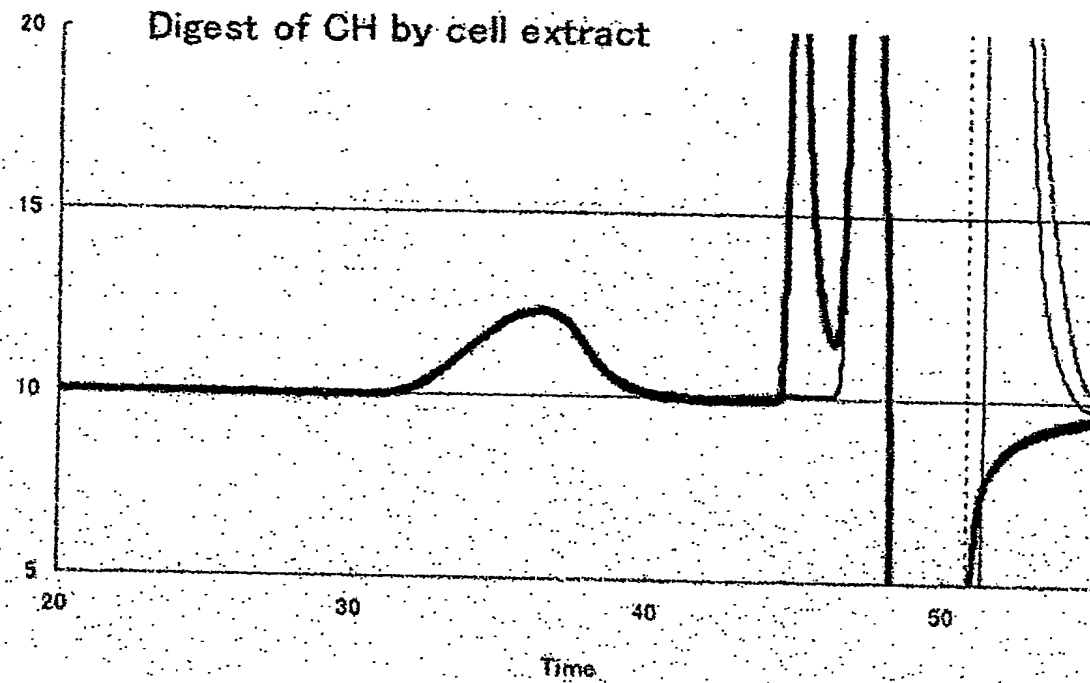
【書類名】

図面

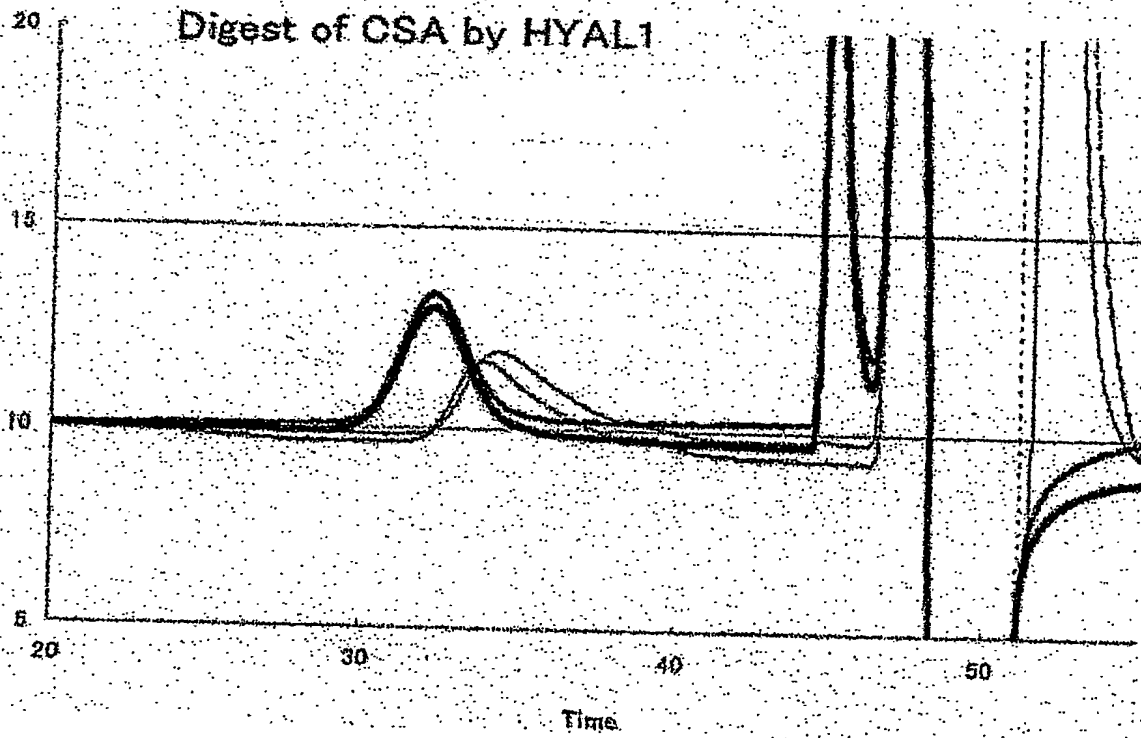
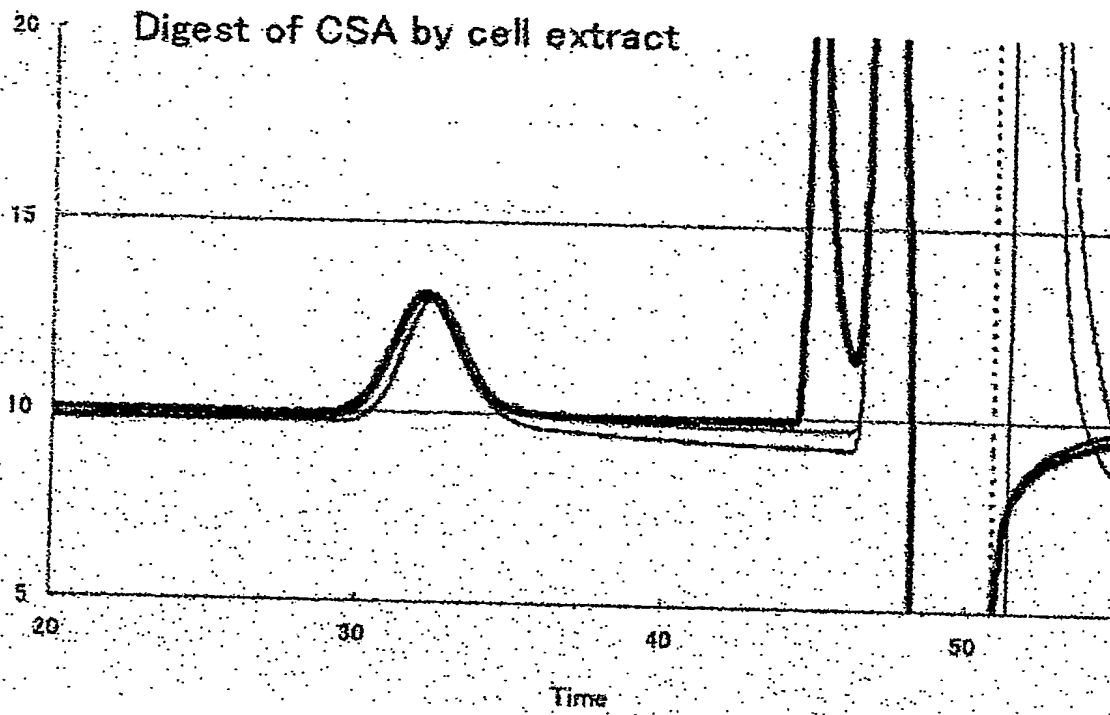
【図 1】



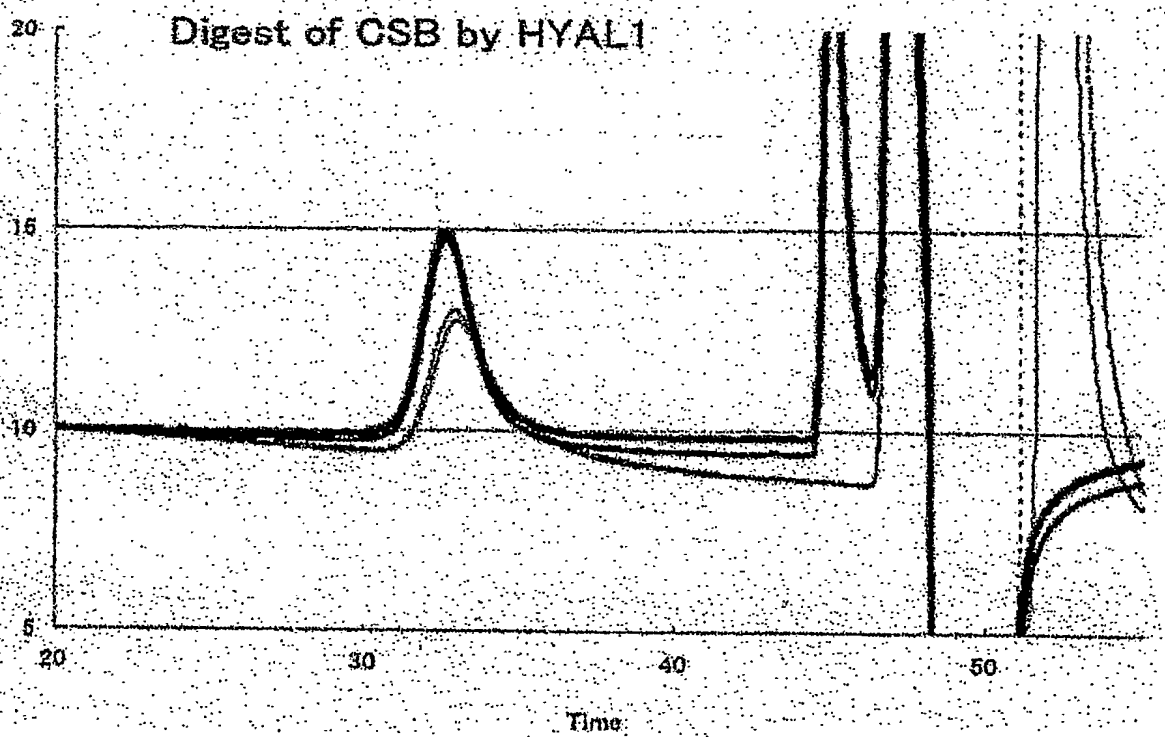
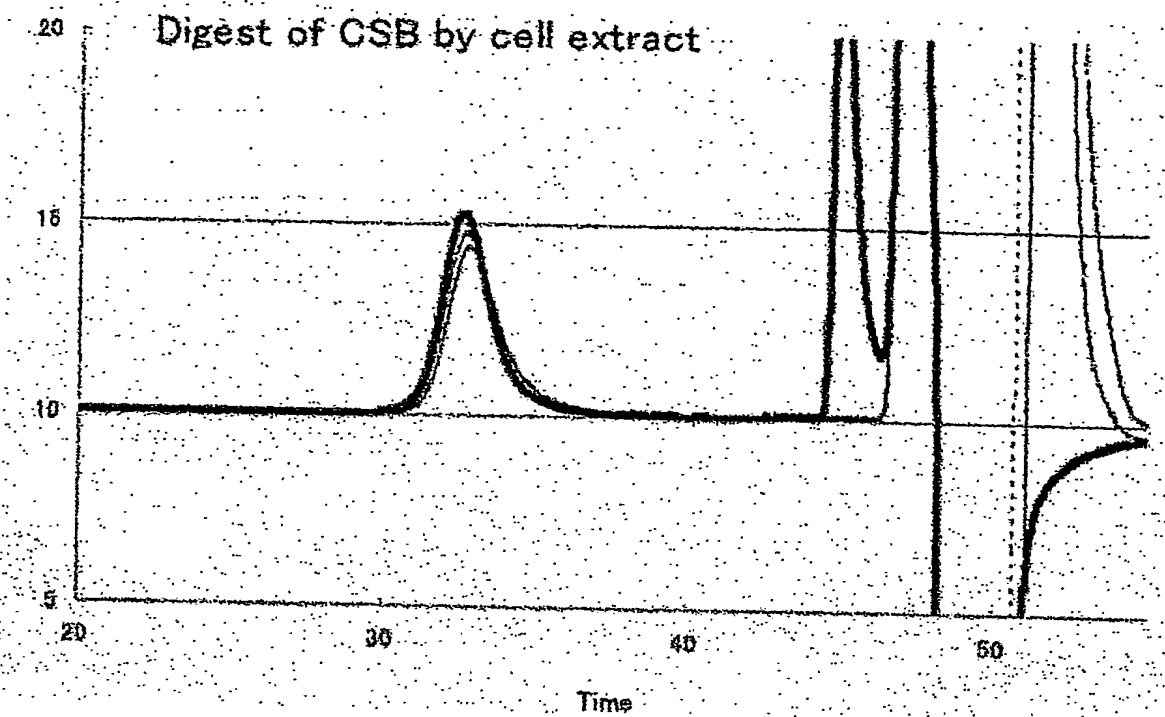
【図 2】



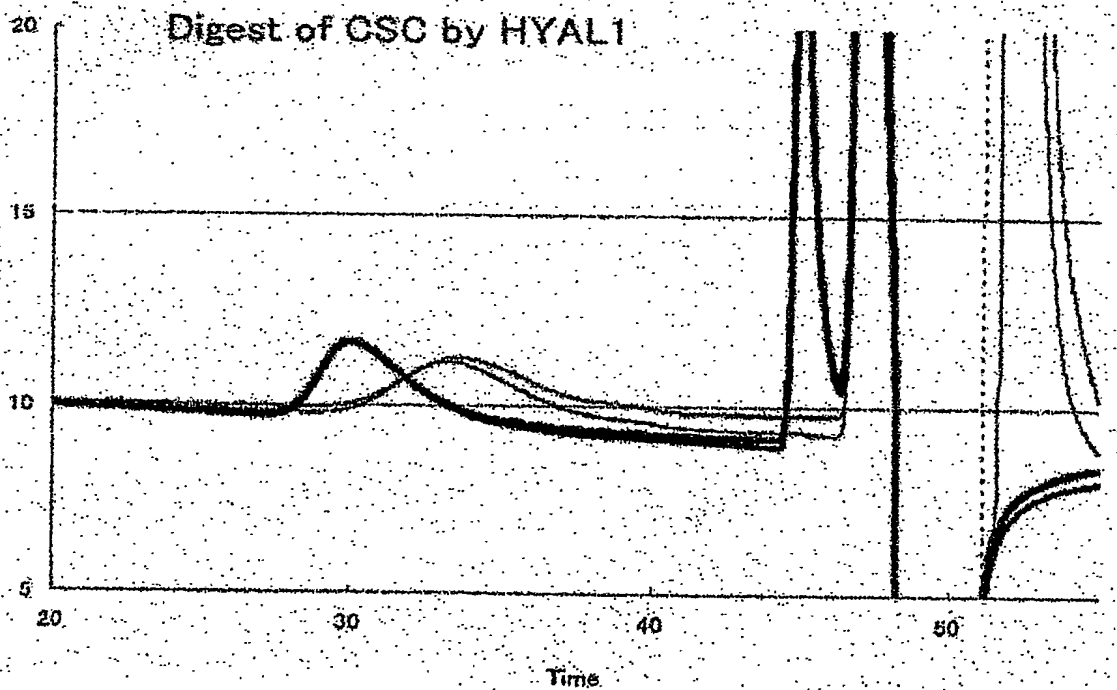
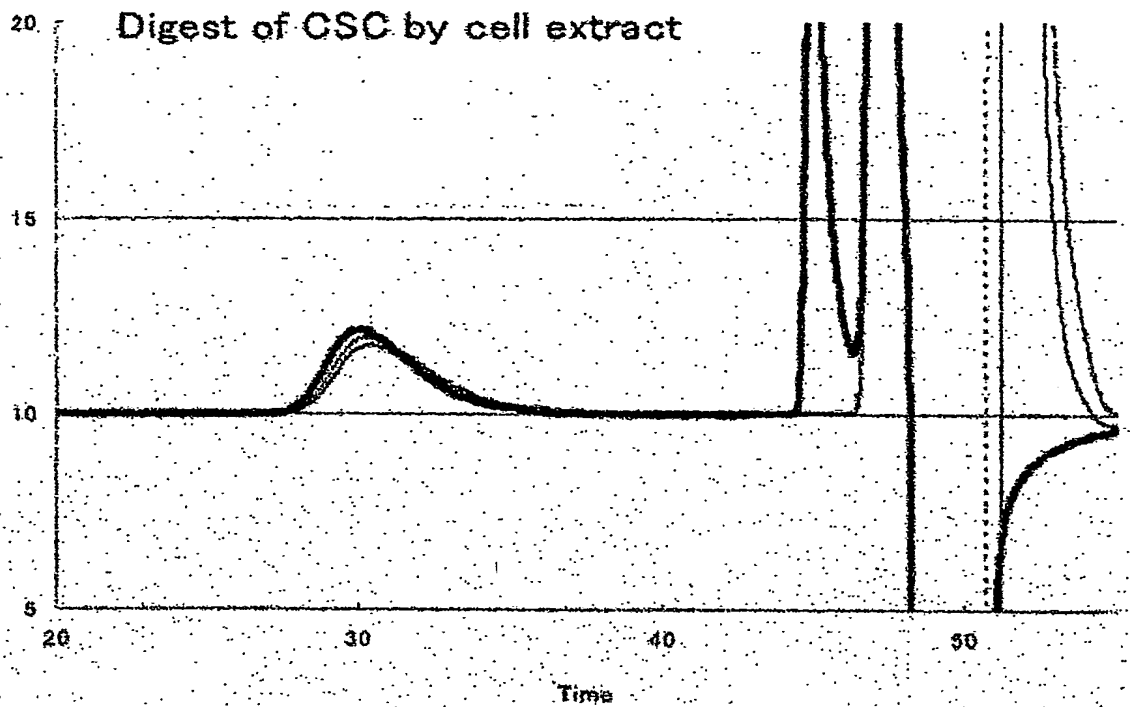
【図 3】



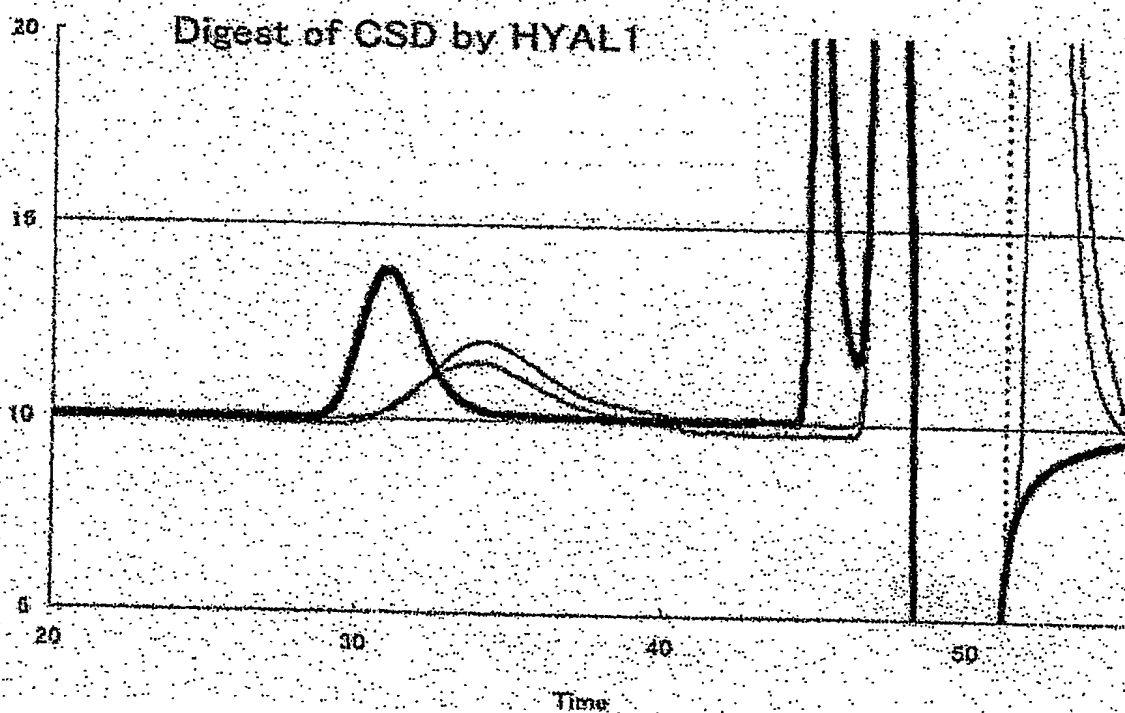
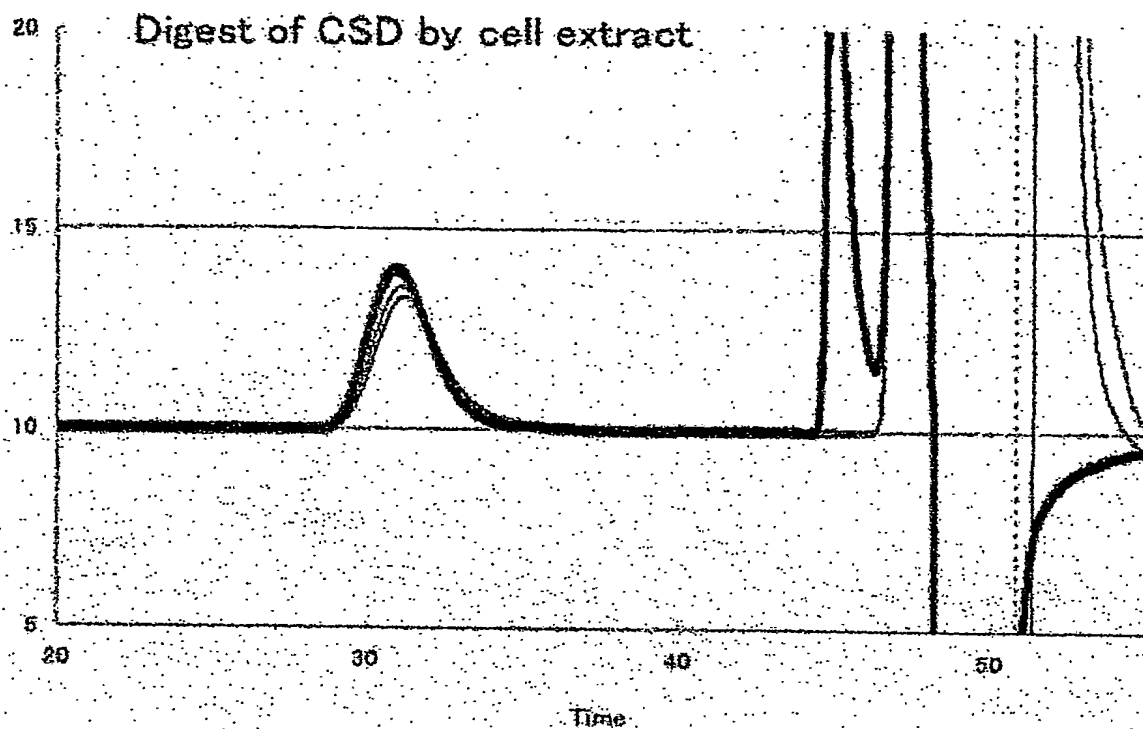
【図 4】



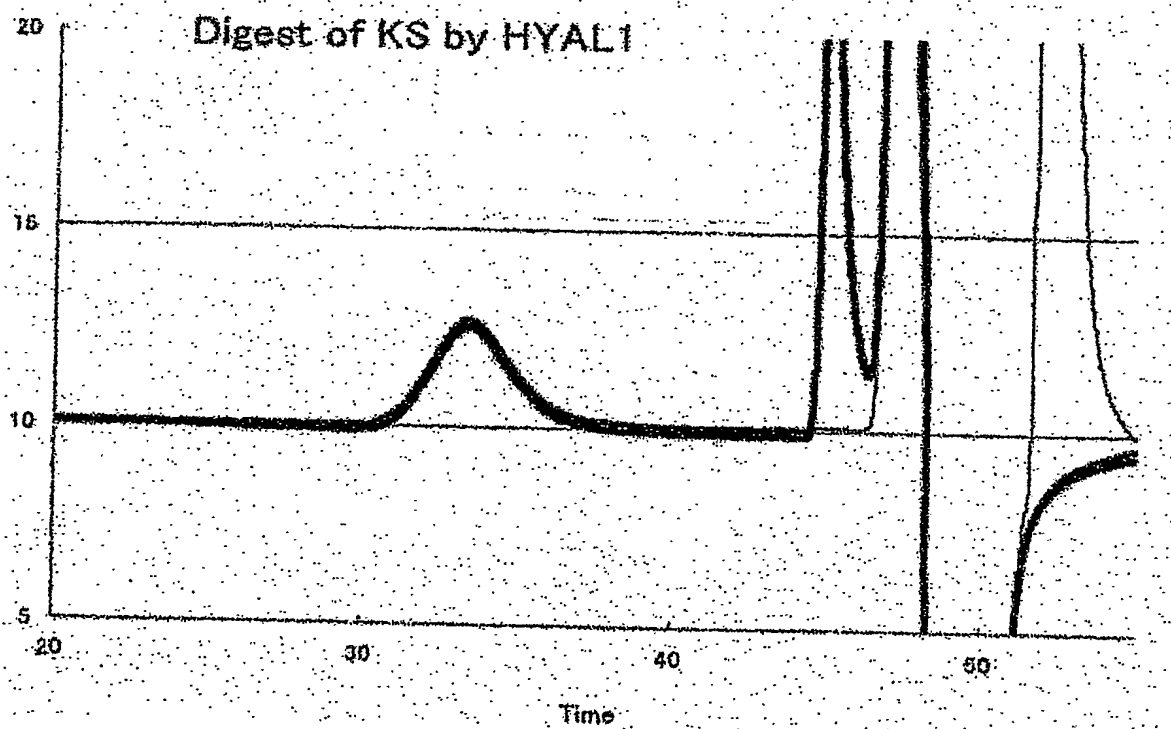
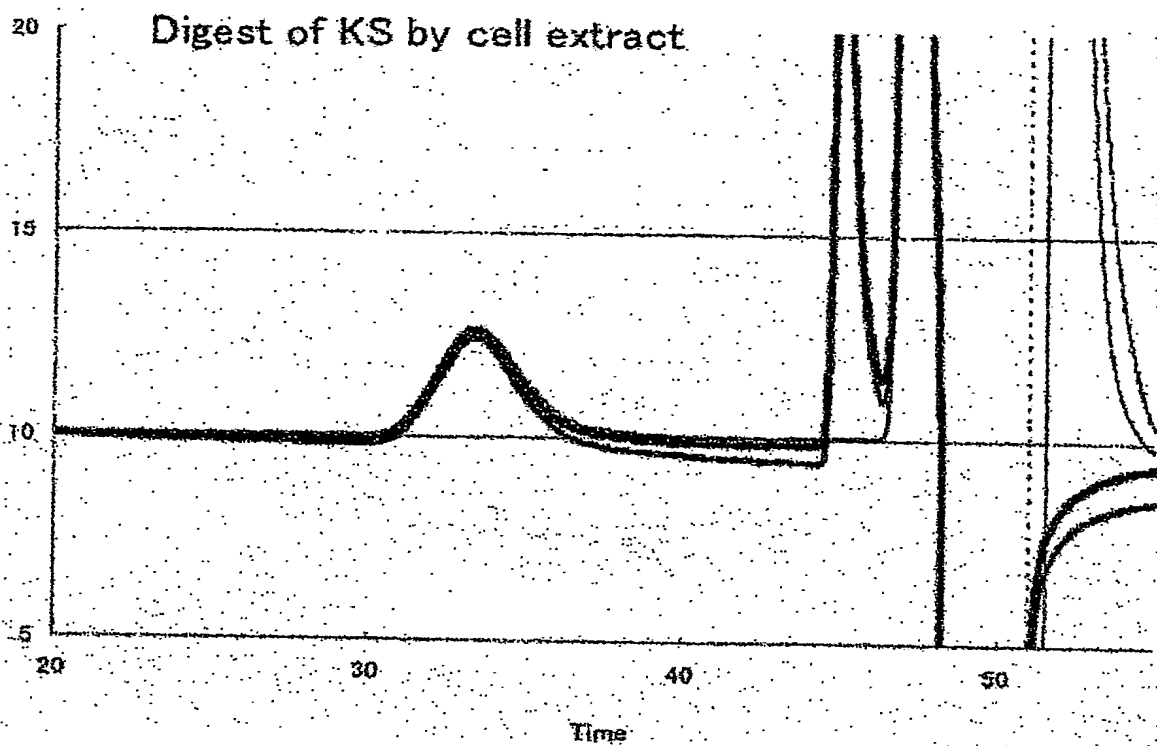
【図 5】



【図 6】



【図7】







【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する触媒等を提供すること。

【解決手段】 下記(A)又は(B)のタンパク質を必須成分とし、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する能力を有する触媒。

(A) 配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(B) 配列番号2で示されるアミノ酸配列における1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は転位したアミノ酸配列を含み、かつ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸A、コンドロイチン硫酸C及びコンドロイチン硫酸Dからなる群から選ばれる1又は2以上の糖鎖を特異的に切断する活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 1 3 9 6 5
受付番号	5 0 3 0 0 6 4 6 0 9 1
書類名	特許願
担当官	鈴木 夏生 6 8 9 0
作成日	平成 1 5 年 4 月 2 4 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成 1 5 年 4 月 1 8 日
-------	--------------------

次頁無

特願 2003-113965

ページ: 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000195524]

1. 変更年月日

1990年 8月20日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

氏 名

生化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**